

PEPTYDOWA MODULACJA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH PODJEDNOSTKI GONADOTROPIN W PRZEDNIM PŁACIE PRZYSADKI SAMIC SZCZURA

PEPTIDERGIC MODULATION OF GONADOTROPIN SUBUNIT GENE
EXPRESSION IN THE ANTERIOR PITUITARY OF FEMALE RATS

Alina GAJEWSKA

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna k. Warszawy

Streszczenie: Aktywność transkrypcyjna genów kodujących podjednostki gonadotropin (α , LH β , FSH β) w przednim płacie przysadki samic szczura zależy od obecności zestawów specyficznych elementów *cis*- i *trans*regulatorowych zlokalizowanych na promotorach tych genów. Głównym stymulatorem aktywności transkrypcyjnej tych genów jest GnRH – hormon pulsacyjnie uwalniany z zakończeń nerwowych w wyniosłości pośrodkowej podwzgórza i uwalniający hormony gonadotropowe. Wykorzystując model pulsacyjnych, dokomorowych infuzji GnRH, β -endorfiny, galaniny i wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP) badano rolę tych peptydów w modulacji ekspresji podjednostek α i LH β mRNA w przednim płacie przysadki owariotomizowanych samic szczura. Ekspresja genów α i LH β była zależna od częstotliwości pulsów GnRH: największą ekspresję mRNA obserwowano po infuzjach z częstotliwością 1 pulsu/godzinę. β -endorfina znacząco obniża ekspresję genów α i LH β , wpływając także na zmniejszenie stabilności ich mRNA w komórkach gonadotropowych. Również VIP, działając poprzez specyficzne receptory VPAC₂, hamuje aktywność układu GnRH w podwzgórzu i obniża poziom mRNA dla podjednostek α i LH β w komórkach gonadotropowych. Natomiast galanina stymuluje ekspresję mRNA dla podjednostek α i LH β w przysadce, jej wpływ zależy od obecności steroidów gonadowych, odbywa się poprzez pobudzające oddziaływanie na aktywność układu GnRH w podwzgórzu i wymaga zaangażowania specyficznych receptorów GALR1 i GALR2. Aktywacja ekspresji genu FSH β zależy zarówno od GnRH, jak i aktywiny, które działając niezależnie i synergistycznie podwyższają poziom FSH β mRNA w przysadce. Peptydowa modulacja (stymulacja lub inhibicja) aktywności endogennego układu GnRH w podwzgórzu prowadzi do znaczących zmian w ekspresji genów kodujących podjednostki gonadotropin, wpływając pośrednio na ich biosyntezę w komórkach gonadotropowych przysadki samic szczura *in vivo*.

Słowa kluczowe: ekspresja genów gonadotropin, przysadka, GnRH, β -endorfina, galanina, wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP), aktywina.

Summary: Transcription activity of genes encoding three gonadotropin subunits: (α , LH β , FSH β) depends on specific *cis*- and *trans*-acting regulatory elements located on their promoters. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) is a crucial neurohormon stimulating these genes transcriptional activity.

Pulsatile intracerebroventricular microinjections of GnRH, β -endorphin, vasoactive intestinal peptide (VIP) and galanin in ovariectomized rats revealed their significant role in the modulation of gonadotropin subunits gene expression. LH β and FSH β mRNA expression were stimulated by low frequency GnRH pulses whereas α subunit mRNA level was stimulated also by high frequency pulses. β -endorphin reduced α and LH β gene expression and diminished the stability of both mRNAs. VIP acting through its specific receptors reduced endogenous GnRH system activity and decreased both α and LH β mRNA level in pituitary gland. Instead, galanin up-regulated GnRH receptor activity and exerted stimulatory effect on α and LH β gene expression. Its effect depended on gonadal steroids and specific galanin receptors. FSH β gene expression was dependent both on GnRH and as well as on activin stimulation and both peptides were acting independently and synergistically. Peptidergic modulation (stimulatory or inhibitory) of endogenous GnRH system activity results in a significant changes of gonadotropin subunits mRNA content and, in consequence, may indirectly influence on gonadotropin biosynthesis activity in female rats.

Key words: gonadotropin genes expression, pituitary, GnRH, β -endorphin, galanin, VIP, activin.

WSTĘP

Gonadoliberyna (GnRH), dekapeptyd syntetyzowany i dojrzewający w około 1200 wyspecjalizowanych neuronach podwzgórza, a następnie uwalniany z ich zakończeń nerwowych w zewnętrznej warstwie wyniosłości pośrodkowej, stanowi kluczowe ogniwo w neuroendokrynnej regulacji rozrodu. Do krążenia wrotnego przysadki wydzielany jest w formie zsynchronizowanych pulsów powodujących pulsacyjne uwalnianie LH i FSH z komórek gonadotropowych. Istnieje ścisła korelacja czasowa pomiędzy każdym pulsem LH i poprzedzającym go pulsem GnRH, jednak zależność ta nie jest tak rygorystyczna w przypadku pulsów FSH. Zmiany pulsacyjnego wzoru uwalniania GnRH (dotyczące zarówno amplitudy, jak i częstotliwości pulsów) charakteryzujące zmienne stany fizjologiczne w cyklu rozrodczym samic warunkują utrzymanie ich funkcji rozrodczych. U samic szczura zidentyfikowano dwa główne wzorce uwalniania GnRH: uwalnianie podstawowe, odznaczające się niską amplitudą i częstotliwością pulsów GnRH oraz uwalnianie okołoolulacyjne (zachodzące po południu fazy proestrus cyklu), w którym gwałtowny wzrost aktywności generatora pulsów GnRH doprowadza do zdecydowanego zwiększenia amplitudy i częstotliwości pulsów uwalnianego GnRH, wynikiem czego jest wyrzut LH [54]. Na błonie komórek gonadotropowych hormon ten wiąże się ze swym specyficznym, sprzężonym z białkiem $G_{q/11\alpha}$ receptorem [77], stymulując aktywację fosfolipazy $C\beta$, która poprzez hydrolizę fosfatydyloinozytolu uwalnia diacyloglicerol i 1,4,5-trójfosforan inozytolu. Gwałtowny wzrost stężenia 1,4,5-trójfosforanu inozytolu w komórce odpowiada za natychmiastową mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego prowadzącą do uwolnienia LH i FSH z komórek gonadotropowych przysadki. Aktywacja diacylogliceroli prowadzi do aktywacji kilku izozymów kinazy białkowej C, czego konsekwencją może być pobudzenie czterech odmiennych szlaków kinaz aktywowanych mitogenem (*MAP kinase*): p42 MAPK (*p42 MAP kinase/extracellular signal-regulated kinase 2*), JNK (*c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) p38MAPK (*p38 MAP kinase/cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein*), BMK (*Big MAP kinase*/

extracellular signal-regulated kinase 5) [62] w komórkach gonadotropowych. Unikalna właściwość kinaz MAP, polegająca na ich zdolności do translokacji do jądra komórkowego i aktywacji różnych czynników transkrypcyjnych na promotorach genów, powoduje, że enzymy te należą do ważnych regulatorów procesów transkrypcyjnych w komórce, jednak ich precyzyjna rola w regulacji ekspresji genów kodujących podjednostki gonadotropin nie jest w pełni wyjaśniona. Rodzina hormonów glikoproteinowych składa się z hormonów przysadkowych luteinizującego (LH), folikulo-tropowego (FSH), tyreotropowego (TSH) oraz łożyskowej gonadotropiny (CG) opisanej u konia i naczelnych. Hormony te są heterodimerami, składającymi się z glikoproteinowej podjednostki α (α GSU) o sekwencji aminokwasowej identycznej dla wszystkich hormonów tej rodziny oraz odrębnej i odpowiedzialnej za specyficzność każdego hormonu, podjednostki β . Obecny stan badań nie pozwala jednoznacznie określić, poprzez jakie szlaki kinaz MAP GnRH mógłby selektywnie regulować ekspresję genów podjednostek gonadotropin w komórkach gonadotropowych. W badaniach Weck i wsp. [95] transkrypcja genu podjednostki α była zależna od aktywacji szlaku PKC (*protein kinase C*) i ERK (*externally regulated kinase*) w komórce, podczas gdy wzrost stężenia wapnia preferencyjnie stymulował transkrypcję genu LH β . Przeciwną zależność obserwowali Saunders i wsp. [71] wykazując, że aktywacja promotora genu α zależna była od wzrostu stężenia wapnia wewnątrz komórki, natomiast genu LH β zachodziła przede wszystkim poprzez aktywację szlaku PKC. Pobudzenia szlaku PKC/ERK w zależnej od GnRH transkrypcji genu LH β nie obserwowali natomiast Yokoi i wsp. [99] wykazując z kolei zaangażowanie szlaku JNK, który poprzez fosforylację białka transkrypcyjnego *c-jun* odpowiada za aktywację kompleksu transkrypcyjnego AP-1. Jednakże wyniki otrzymane przez Harrisa i wsp. [28] wykazują stymulację szlaków ERK i JNK w komórkach gonadotropowych zarówno w podstawowej, jak i GnRH-zależnej aktywacji promotora genu LH β .

ELEMENTY REGULATOROWE NA PROMOTORZE GENU α

Obecnie wiadomo już, że na promotorach genów podjednostek α , LH β i FSH β istnieją odrębne układy elementów *cis*- i *trans*-regulatorowych. Za specyficzną aktywację genu α w komórkach gonadotropowych przysadki odpowiedzialny jest zestaw kilkunastu elementów regulatorowych promotora, wśród których szczególną rolę odgrywa miejsce CRE (*cAMP-responsive element*) zlokalizowane w pozycji *cis* pomiędzy -150 a -200 pz promotora. U ludzi, na promotorze genu α występują dwa (o sekwencji TGACGTCA), zaś u myszy jedno (o sekwencji TGATGTCA) palindromiczne miejsce CRE, do których w pozycji *trans* mogą wiązać się: białko CREB, białko modulujące aktywność CRE oraz białko *c-Jun* aktywujące czynniki transkrypcyjne ATF1 i ATF2 [29]. Elementem *cis*-regulatorowym zaangażowanym w podstawową ekspresję genu α w komórkach gonadotropowych jest także miejsce PGBE (*pituitary glycoprotein hormone basal element*), występujące na promotorze ludzkim w pozycji -329/-320, zaś na mysim pomiędzy -344/-300 pz, do którego wiążą się *trans*-działające

białka LH2 [67], Lim3 [85] i pLIM [32] należące do rodziny białek homeotycznych LIM. Z miejscem PGBE sąsiaduje miejsce α BE (α basal element) składające się z obszaru α BE1 (–316/–302 pz) i α BE2 (–296/–285 pz), do których wiążą się białka α BP1 i α BP2. Interakcja białek wiążących się do miejsc PGBE i α BE powoduje synergistyczny wpływ na transkrypcję genu α [30].

W podstawową transkrypcję tego genu zaangażowane jest także, należące do rodziny homeotycznej, białko Pitx-1 (*pituitary homeobox factor-1*) wiążące się do miejsca Pitx-1-RE (na promotorze ludzkim w pozycji –80/–60 pz, zaś mysim w pozycji –398/–385pz) [85]. Białko Pitx-1 kodowane jest przez gen należący do podrodziny genów *bicoid* typu *homeobox* (*bicoid-related homeobox genes*) [19] i zaangażowane jest w aktywację wielu genów w komórkach już zróżnicowanych, w tym kluczowych w aktywności osi rozrodczej trzech genów podjednostek gonadotropin (α , LH β , FSH β) i genu dla receptora GnRH. Do obszaru GSE (*gonadotrophic specific element*), w pozycji –146/–111 pz (u ludzi) lub –398/–385pz (u myszy) wiąże się czynnik steroidogenny SF-1 należący do nadrodziny białek receptorów jądrowych o nieznanym ligandzie (*orphan nuclear receptor*), którego wpływ na transkrypcję genu α jest autonomiczny i niezależny od obecności innych czynników transkrypcyjnych [30]. Badania aktywności transkrypcyjnej promotora ludzkiego genu α dowodzą, że do jej wzrostu przyczynia się także zlokalizowany w pozycji –161/–141 pz, *cis*-działający α -ACT (α activating element), do którego w pozycji *trans* wiążą się poprzez palce cynkowe białka GATA2 i GATA3 [78]. Należą one do rodziny białek (*GATA binding proteins*) rozpoznających sekwencję GATA na promotorze. W procesie tym uczestniczą również *cis* aktywne obszary *E-box* promotora (pozycja –21/–16 oraz –51/–45), z którymi w pozycji *trans* współpracują białka α EB1, α EB2 oraz czynnik USF (*upstream stimulatory factor*) należące do rodziny białek typu HLH (*helix-loop-helix*) [36]. Eksperymenty na mysich liniach komórek gonadotropowych dowodzą, że za wrażliwość genu α na stymulację GnRH odpowiedzialne są dwa elementy regulatorowe. Jednym z nich jest położony w pozycji –416/–385 promotora obszar GnRH-RE (*GnRH response element*) [73], do którego wiąże się *trans* działające białko z rodziny białek transkrypcyjnych Ets. Drugim *cis*-regulatorowym elementem uczestniczącym w aktywacji transkrypcyjnej genu po stymulacji GnRH jest region PGBE promotora, do którego wiążą się białka z rodziny białek homeotycznych LIM: LH2 [67] i Lhx [85].

ELEMENTY REGULATOROWE NA PROMOTORZE GENU LH β

Znaczący postęp w poznaniu budowy i działania promotora genu LH β stał się możliwy dzięki udanej generacji kilku linii myszy transgenicznym, a zwłaszcza mysiej, gonadotropowej linii komórkowej L β T2 charakteryzującej się ekspresją podjednostki LH β [1]. Wszystkie dotychczas zidentyfikowane elementy regulatorowe zlokalizowane na promotorze genu LH β znajdują się w obszarze –500 pz od miejsca inicjacji transkrypcji, a identyfikacja elementów *cis*-regulatorowych w obrębie tego promotora doprowadziła do wyodrębnienia dwóch obszarów, które tworzą dystalny region A (–490/352 pz)

oraz proksymalny region. B (-207/82 pz). U szczura, w obszarze dystalnym promotora, w pozycjach -450/-434 pz i pozycji -366/-354 pz znajdują się dwa *cis*-regulatorowe miejsca wiążące czynnik transkrypcyjny Sp1. Białko Sp-1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych Cys₂-His₂ wiążących się z DNA za pomocą palców cynkowych po rozpoznaniu sekwencji bogatych w GC. Mutacje uniemożliwiające wiązanie się białka Sp-1 z tym regionem promotora znacząco redukują zarówno jego podstawową aktywność, jak też osłabiają stymulacyjny wpływ wywierany na ten gen przez GnRH [39]. Ponadto w pozycji -443/-434 pz szczurzego promotora znajduje się tzw. region CArG (*CArG box*) o sekwencji CCATTTTGG [94] odgrywający krytyczną rolę we wrażliwości genu LHβ na pulsację GnRH. Sekwencja CArG nie występuje na bydlęcym promotorze genu LHβ i do tej pory nie poznano białka regulatorowego wiążącego się do tego obszaru promotora. Natomiast w obrębie proksymalnej części promotora genu LHβ do specyficznych *cis*-regulatorowych sekwencji wiążą się trzy *trans*-działające białka regulatorowe. Pierwszym z nich jest czynnik steroidogenny SF-1 (*steroidogenic factor-1*), który do DNA promotora genu LHβ u szczura wiąże się w obrębie dwóch funkcjonalnych miejsc GSE znajdujących się w pozycji -128/-121 (sekwencja TGACCTG) i -59/-52 (sekwencja CGGCCTTG) [27], a których znaczenie w aktywacji tego genu wykazano zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [34]. U myszy pozbawionych genu *fitz-1* kodującego białko SF-1, poziom mRNA dla podjednostki LHβ był niewykrywalny [35], zaś mutacja w obrębie miejsca 5'-GSE bydlęcego promotora znacząco zmniejszyła ekspresję genu w stosunku do poziomu stymulowanego przez niezmutowany promotor [42]. Białkiem o kluczowej roli w regulacji transkrypcji genu LHβ jest białko Egr-1 (*early growth response protein*) należące do rodziny białek transkrypcyjnych charakteryzujących się obecnością palców cynkowych z motywami Cys₂-His₂ i których geny ulegają szybkiej aktywacji (*immediate-early response genes*). W komórkach przysadki gwałtowna indukcja ekspresji tego białka zachodzi tylko po stymulacji promotora genu LHβ przez GnRH, dzięki czemu może być ono uważane za jeden z głównych efektorów (*downstream effector*) stymulacji przez ten neurohormon [100]. Białko Egr-1 zawiera wewnętrzną, 34-aminokwasową domenę inhibitorową, a białkami regulującymi aktywność białka Egr-1 są białka Nab-1 i Nab-2 (*nuclear growth factor 1-A binding proteins*), których funkcją jest represja aktywności białka Egr-1 [83]. Wydaje się, iż białko Nab-1 może być jednym z istotnych elementów zaangażowanych w regulację aktywności promotora genu LHβ. Miejscami *cis*-regulatorowymi odpowiedzialnymi za wiązanie białka Egr-1 na promotorze genu LHβ są pozycje -112/-105pz (sekwencja CGCCCCCG) oraz -50/-42pz (sekwencja: CGCCCCAC) [44], a mutacje w ich obrębie całkowicie hamują zdolność białka Egr-1 do aktywacji tego promotora [98]. W pozycji -100/-95pz (sekwencja AGATTA), pomiędzy sekwencjami wiążącymi białko Egr-1, znajduje się miejsce wiązania białka Pitx-1, czwartego czynnika transkrypcyjnego zidentyfikowanego na promotorze genu LHβ [85]. Ekspresja białka Pitx1 w heterologicznych liniach komórkowych aktywuje promotor genu LHβ dzięki interakcji z białkami SF-1 i Egr-1 [84]. Ostatnie badania wskazują na obecność drugiego, zlokalizowanego w pozycji -73/-52 pz miejsca wiążącego białko Pitx-1 na tym promotorze [37]. Do pełnej, zależnej od GnRH aktywacji promotora genu LHβ niezbędne

jest współdziałanie wszystkich wiążących się doń białek regulatorowych. Ze względu na specyfikę lokalizacji miejsc *cis*-regulatorowych, które odpowiadają za wiązanie tych białek do właściwych obszarów promotora, wydaje się, iż aktywująca transkrypcję interakcja wszystkich białek regulatorowych wymaga udziału niezidentyfikowanego jeszcze kompleksu adaptorowego. Zaproponowano model [38], zgodnie z którym pojawiające się po aktywacji receptora GnRH białko Egr-1 wiąże się ze swymi miejscami na promotorze i wraz z białkami SF-1 i Pitx1 tworzy trzelementowy, proksymalny kompleks regulatorowy synergistycznie oddziałujący z dystalnie wiążącymi się białkami Sp-1 i nieznanym białkiem z obszaru CARG. Kluczową rolę w integracji wpływów wywieranych przez białka Sp-1 i Egr-1 pełni białko SF-1 [38], zaś białko Pitx-1 pełni rolę funkcjonalnego liganda dla białka SF-1.

ELEMENTY REGULATOROWE NA PROMOTORZE GENU FSH β

Stosunkowo najmniej poznany jest układ *cis*- i *trans*-regulatorowych elementów działających na promotorze genu FSH β , jednakże uzyskanie linii gonadotropowej L β T2 pozwala na coraz pełniejszą identyfikację obszarów kluczowych dla aktywacji tego genu. W pozycjach -120 i -83 pz promotora genu szczura zlokalizowano dwa miejsca wiążące białko aktywatorowe AP-1 (*activator protein*) [81], które są zaangażowane w zależną od GnRH stymulację tego genu [33], lecz nie są odpowiedzialne za stymulację tego genu przez aktywinę. W aktywacji owczego promotora genu FSH β (oFSH β) biorą też udział dwa miejsca *cis*-regulatorowe zlokalizowane w dystalnej części promotora: -4152/-2878 pz oraz -2550/-1809 pz [90]. Natomiast w proksymalnej części promotora genu FSH β znajdują się dwa miejsca wiążące czynnik SF-1, a także jedno miejsce wiążące czynnik transkrypcyjny NFY (*nuclear transcription factor Y*) [69]. Na 5'końcu promotora owczego genu FSH β , pomiędzy pozycją -2067 a -120 pz, zidentyfikowano sześć, zaś na promotorze szczurzego genu – trzy [64] miejsca wrażliwe na progesteron, dzięki którym może on bezpośrednio modulować aktywność transkrypcyjną genu. Również białka z rodziny homeotycznej LIM uczestniczą w regulacji podstawowej aktywności promotora genu FSH β , gdyż do miejsca P2 (-140/-50- pz) wiąże się białko Ptx-1, zaś do obszaru -230/-199 pz – białko Pitx2 [82]. Ponadto, białka te zaangażowane są również w aktywację zależną od GnRH (Ptx1) oraz aktywiny (Ptx2). Stymulacja aktywności promotora genu FSH β przez aktywinę odbywa się przede wszystkim poprzez kompleks białek Smad 3/Smad 4 (*mad related protein*) będących homologami białek Mad (*Max dimerizer*). Smad3/Smad4 wiążą się do sekwencji palindromicznej GTCTAGAC lub do motywu CAGA. Na promotorze genu szczura kompleks ten oddziałuje w regionie SBE (*Smad Binding Element*) zlokalizowanym w pozycji -281/-253 pz. Natomiast na promotorze owczego genu FSH β zidentyfikowano trzy regiony niezbędne do pełnej aktywacji promotora przez aktywinę: obszar dystalny (-973/-962 pz) wiążący białko Smad4, miejsce -134, do którego przyłącza się kompleks białek Smad4 z należącymi do rodziny białek homeotycznych TALE (*three amino acid loop extension*) białkami Pbx1 (*pre B cell transformation-related transcription*

factor) i Prep1 (*Pbx regulating protein-1*) oraz miejsce -167 również wiążące białka Pbx1 i Prep1 [2]. Ostatnio wykazano także, iż należące do rodziny TGF β (*transforming growth factors β*) i odpowiedzialne za morfogenezę kości i tkanki chrzęstnej białka BMP6 i BMP7 (*bone morphogenetic proteins*) stymulują aktywność owczego promotora genu FSH β , a także ekspresję mRNA dla tej podjednostki *in vivo* oraz *in vitro* [34].

PULSY GnRH A EKSPRESJA GENÓW PODJEDNOSTEK α , LH β I FSH β *IN VIVO*

Zmienna częstotliwość pulsów GnRH jest nie tylko głównym elementem regulującym podstawowe i okołooowulacyjne uwalnianie gonadotropin, ale pełni też krytyczną rolę w specyficznej aktywności transkrypcyjnej genów ich podjednostek. Optymalną techniką służącą badaniu zmian poziomu mRNA kodujących podjednostki gonadotropin w przednim płacie przysadki *in vivo* jest infuzja do trzeciej komory mózgu (bezpośrednio w pobliże układu podwzgórze-przysadka) substancji, które mogłyby wpływać na poziom ich ekspresji. Takie podejście metodologiczne wydatnie zmniejsza, pojawiające się przy podaniu do krążenia ogólnego, ryzyko degradacji infundowanych substancji, pozwalając tym samym na stosowanie dawek zbliżonych do stężeń fizjologicznych, eliminuje możliwość ich oddziaływania na inne tkanki, pozwala też uniknąć trudności w przenikaniu tych substancji przez barierę krew-mózg. Dokomorowo infundowane substancje mogą przeniknąć do krążenia wrotnego przysadki przy udziale tanocytów, komórek wyściełających ściany i podstawę trzeciej komory [3] i w konsekwencji modulować aktywność transkrypcyjną genów kodujących podjednostki gonadotropin w przysadce. W badaniach własnych [20] wykorzystujących model owariotomizowanych samic, którym do trzeciej komory mózgu pulsacyjnie infundowano GnRH, obserwowano zależną od częstotliwości tych pulsów ekspresję genów kodujących podjednostki LH. Analiza *Northern-blot* wykazała bowiem, iż największa stymulacja poziomu mRNA dla podjednostki α i LH β wystąpiła po infuzjach z częstotliwością 1 puls/godzinę, natomiast po infuzjach z częstotliwością 4 pulsy/godzinę aktywacji ulegał jedynie gen podjednostki α . Zatem, promotory obu genów wydają się odznaczać specyficzną wrażliwością na częstotliwość pulsów GnRH: promotor genu α GSU może być bowiem aktywowany przez pulsy GnRH o takiej częstotliwości, która jest już nieefektywna w aktywacji promotora genu LH β . W tych samych badaniach stwierdzono również, iż u samic szczura w fazie diestrus, a więc w okresie najmniejszej endogennej aktywności układu GnRH w podwzgórze, pulsacyjnie infundowany GnRH powodował największy wzrost poziomu α i LH β mRNA oraz uwalniania LH z komórek gonadotropowych przysadki, podczas gdy w proestrus, w fazie maksymalnej aktywności, wpływ egzogenego GnRH na ekspresję mRNA obu podjednostek oraz uwalnianie LH, choć znaczący, był jednak mniej wyraźny niż w diestrus [20]. GnRH jest także głównym regulatorem syntezy i uwalniania hormonu folikulotropowego (FSH), niezbędnego w procesie dojrzewania pęcherzyków jajnikowych, którego brak w organizmie samicy wywołuje bezpłodność

spowodowaną zablokowaniem folikulogenezy. Poziom ekspresji genu FSH β odpowiedzialnego za specyficzność biologiczną tego hormonu, jest – podobnie jak genów podjednostek α i LH β – zależny od częstotliwości pulsów GnRH oddziałujących na przysadkowy receptor GnRH. W badaniach własnych wykonanych na modelu samic owariotomizowanych, a więc pozbawionych oddziaływań sterydów gonadowych i peptydów jajnikowych (aktywiny, inhibiny i folistatyny), największy wzrost poziomu FSH β mRNA (mierzony techniką *Northern-blot*) oraz uwalniania tego hormonu z komórek gonadotropowych stwierdzono po pulsach GnRH infundowanych do trzeciej komory mózgu z częstotliwością 1 puls/godzinę [21]. Jednocześnie, w badaniach tych obserwowano, iż ze wzrostem częstotliwości egzogennych pulsów GnRH zanika wrażliwość genu FSH β na stymulacyjne działanie tego neurohormonu [21]. Zależną od niskiej częstotliwości pulsów GnRH ekspresję genu FSH β zaobserwowano także u samców po iniekcjach dożylnych [26] oraz w komórkach linii gonadotropowej L β T2 [5].

β -ENDORFINA A EKSPRESJA GENÓW α I LH β W PRZYSADCE *IN VIVO*

Uwalnianie GnRH, pozostając pod kontrolą endogenego generatora pulsów GnRH [55], podlega także bezpośrednim i pośrednim modyfikacjom dzięki neurotransmiterom i peptydom wpływającym na aktywność neuronów GnRH. Jednym z takich peptydów jest β -endorfina, której prekursorem w organizmie jest proopiomelanokortyna (POMC). W centralnym układzie nerwowym istotnym źródłem syntezy β -endorfiny są neurony POMC jądra łukowatego podwzgórza, skąd projektują do innych obszarów mózgu [17]. Ponadto, β -endorfina syntetyzowana jest także w przednim i pośrednim płacie przysadki mózgowej [51] i taka lokalizacja w obrębie układu podwzgórze-przysadka umożliwia jej znaczący udział w regulacji uwalniania zarówno neurohormonów podwzgórzowych, jak i hormonów przysadkowych. Hamujące działanie β -endorfiny na uwalnianie LH z komórek gonadotropowych odbywa się głównie poprzez aktywację μ receptorów będących produktem genu *Mor-1* [92]. Wykazano, iż pobudzenie tych receptorów, występujących w jądrze łukowatym [61] i w zawierającej ciała neuronów GnRH okolicy przedwzrokowej (MPOA) [12], powoduje zmiany w aktywności podwzgórzowych neuronów noradrenergicznych [63] i dopaminergicznych [66], co w konsekwencji wpływa na zahamowanie uwalniania GnRH z wyniosłości pośrodkowej podwzgórza. Hamujące działanie β -endorfiny na uwalnianie GnRH z zakończeń nerwowych może także odbywać się poprzez aktywację receptorów μ zlokalizowanych na neuronach β -endorfinergicznych [41], czyli poprzez ultrakrótką pętlę sprzężenia zwrotnego. Natomiast para- i/lub autokrynnne oddziaływanie β -endorfiny możliwe jest poprzez zlokalizowane w obrębie wyniosłości pośrodkowej receptory μ występujące zarówno na zakończeniach neuronów, jak i tanocytach [4]. Poprzez bezpośrednie połączenia synaptyczne pomiędzy aksonami neuronów proopiomelanokortynowych a neuronami GnRH w obszarze przedwzrokowym podwzgórza istnieje także droga bezpośredniego wpływu opioidów na aktywność neuronów GnRH [48] Udokumento-

wane, hamujące zaangażowanie β -endorfiny w uwalnianiu GnRH z wyniosłości pośrodkowej podwzgórza stwarza przesłanki do przypuszczenia, że skutkiem takiego działania może być nie tylko obniżone uwalnianie LH z przysadki, lecz w konsekwencji także zmniejszona biosynteza gonadotropin w komórkach gonadotropowych. W badaniach własnych wykorzystujących technikę *Northern-blot* obserwowano, że po pulsacyjnych, dokomorowych infuzjach β -endorfiny następuje obniżenie poziomu mRNA dla obu podjednostek LH w przysadce [20]. Nie można wykluczyć, że efekt ten był wynikiem bezpośredniego, przysadkowego oddziaływania infundowanej β -endorfiny na uwalnianie LH [13]. Jednak bardziej prawdopodobne wydaje się być jej pośrednie, *via* zahamowanie uwalniania GnRH obniżające działanie na zawartość obu mRNA. Ponadto, eksperymenty te wykazały także, iż GnRH oraz β -endorfina wywołują przeciwstawne efekty na długość ogonków poliadenylacyjnych poly (A) na 3' końcu α i LH β mRNA. O ile bowiem egzogeny GnRH spowodował wydłużenie regionu poly (A) mRNA dla obu podjednostek w stosunku do wielkości obserwowanej po owariektomii, to podanie β -endorfiny zmniejszyło długość poly(A) na obu badanych mRNA do poziomu obserwowanego u samicy nieowariektozowanej [20]. Tak więc zależna od rodzaju interwencji fizjologicznej zmienna długość poly (A) obserwowana może być nie tylko wskazówką co do stabilności poszczególnych mRNA, lecz także indeksem stopnia ich stymulacji przez GnRH.

GALANINA A EKSPRESJA GENÓW α I LH β W PRZYSADCE *IN VIVO*

Także galanina, 29/30 aminokwasowy peptyd po raz pierwszy wyizolowany z komórek jelita cienkiego świni, a wkrótce wykryty zarówno w obwodowym, jak i centralnym układzie nerwowym [75], jest peptydem, który w znaczącym stopniu uczestniczy w modulacji uwalniania GnRH/LH z układu podwzgórze-przysadka. W obrębie centralnego układu nerwowego najwyższe stężenia galaniny stwierdzono w podwzgórzu, a zwłaszcza w obrębie wyniosłości pośrodkowej, w obszarze przedwzrokowym w jądrze łukowatym, przykomorowym, nadwzrokowym i grzbietowo-przyśrodkowym oraz poza podwzgórzem: w miejscu sinawym i jądrze pasma samotnego. Ekspresja mRNA dla galaniny w neuronach GnRH [52], jak też zmieniająca się w cyklu estralnym jej zawartość w wyniosłości pośrodkowej ze szczytem występującym w fazie proestrus [50] wskazywały, że syntetyzowana w podwzgórzu galanina może być bezpośrednio zaangażowana w modulację neurosekrecji GnRH i okołowulacyjnego uwalniania LH z komórek przysadki. Ponadto, wyraźnie podwyższony poziom mRNA dla galaniny obserwowany w neuronach GnRH ponad 24 godziny po uwolnieniu LH [18] sugerował, że jej synteza może być wymagana również w następnych fazach cyklu estralnego. Biorąc pod uwagę fakt, iż galanina jest syntetyzowana w neuronach podwzgórza, uwalnia się pulsacyjnie i synchronicznie z GnRH, a jej antagonistą hamuje uwalnianie GnRH i pulsację LH [50], może być ona istotnym czynnikiem zaangażowanym w fizjologiczną regulację pulsacyjnej aktywności neuronów GnRH. Istnieją zatem

przesłanki, iż podobnie jak β -endorfina, także galanina może uczestniczyć w modulacji biosyntezy LH *in vivo*. Istotnie, w badaniach własnych wykonanych na owarietomizowanych i suplementowanych steroidami gonadowymi samicach szczura, które otrzymywały pulsacyjne (1 puls/godzinę przez 5 godzin), dokomorowe infuzje galaniny analiza *Northern-blot* wykazała znaczące podwyższenie poziomu mRNA dla podjednostek α i LH β w przysadce [24]. Efektywność dokomorowych pulsów galaniny, podawanych z częstotliwością optymalną do aktywacji tych genów przez GnRH, może być więc konsekwencją pobudzającego działania egzogennej galaniny na pulsacyjną aktywność neuronów GnRH. Także niepodwyższony w odniesieniu do grupy traktowanej samym GnRH poziom α i LH β mRNA obserwowany po jednoczesnej infuzji GnRH i galaniny wskazuje, że to układ GnRH w podwzgórzu odgrywa kluczową rolę w modulacyjnych oddziaływaniach galaniny na ekspresję genów LH w przysadce [24]. Brak addytywnego oddziaływania GnRH i galaniny sugeruje wspólną dla obu neuropeptydów i zależną od GnRH drogę aktywacji jego receptora przez galaninę [24]. Istniejące dane dowodzą, że modulacja pobudzenia neuronów GnRH może również odbywać się pośrednio, poprzez wpływ galaniny na aktywność neuronów POMC, które w podwzgórzu brzuszno-przyśrodkowym tworzą synapsy z neuronami galaninerгіcznymi [31]. Ponadto, na neuronach POMC zidentyfikowano też receptory galaninerгіczne [7]. W obszarze jądra łukowatego, głównego miejsca lokalizacji neuronów POMC, galanina oddziałuje na nie zarówno na poziomie presynaptycznym [43] zmniejszając ich aktywację glutaminergiczną, jak też i na poziomie postsynaptycznym [65]. Jeżeli więc galanina zmniejsza hamujące działanie neuronów POMC wywierane na neurony GnRH, to tym samym może również pośrednio stymulować uwalnianie GnRH z zakończeń nerwowych, a zatem wpływać na aktywność receptora GnRH. Konsekwencją aktywacji receptora GnRH jest pobudzenie aparatu biosyntezy gonadotropin w komórce. Istotnie, w badaniach własnych wykazano, że pulsacyjne dokomorowe infuzje galaniny podawane owarietomizowanym i suplementowanym steroidami samicom szczura spowodowały zarówno wzrost ilości miejsc wiążących GnRH, jak i podwyższenie jego powinowactwa do receptora w przednim płacie przysadki [24]. Regulacyjne znaczenie dla aktywacji receptora GnRH może mieć również kolokalizacja galaniny i GnRH występująca w około 45% neuronów GnRH samic szczura [57], jak też fakt, iż neuropeptydy te są jednocześnie uwalniane z zakończeń nerwowych. Wiadomo bowiem, iż zarówno sekrecja, jak i postsynaptyczne działanie neuropeptydu podlega modyfikacji przez substancje, które są syntetyzowane, przechowywane i uwalniane z tej samej komórki [44]. Istnieją też dane wskazujące, iż galanina uwalniana z zakończeń neuronów GnRH może wzmagać synchronizację i wzmocniać oddziaływania GnRH na poziomie receptora [49].

Fizjologiczne funkcje galaniny są regulowane przez specyficzne receptory błonowe należące do rodziny białek G. Dotychczas zidentyfikowano trzy podtypy receptorów galaniny, lecz w regulacji neuroendokrynnej zaangażowane są tylko receptory GAL-R1 [60] i GAL-R2 [59], których mRNA wykryto w: podwzgórzu, paśmie ukośnym Broca, obszarze przedwzrostkowym, jądrze nadskrzyżowaniowym, jądrze okołokomorowym, jądrze łukowatym, jądrze grzbietowo-przyśrodkowym i w obrębie jądra łukowatego. Rozmieszczenie miejsc wiążących galaninę w podwzgórzu szczura [45] jest skorelowane z obecnością gęstej sieci perikarionów, dendrytów i włókien galaninerгіcznych w obszarze

przedwzrokowym, w jądrze łukowatym, grzbietowo-przyśrodkowym, nadskrzyżowaniowym oraz około- i przykomorowym [75]. Choć obecność mRNA dla GAL-R2 wykryta w obszarze przedwzrokowym, jądrze grzbietowo-przyśrodkowym i łukowatym może świadczyć o post-synaptycznej lokalizacji receptorów, to brak mRNA dla GAL-R1 i GAL-R2 w wyniosłości pośrodkowej przy jednoczesnym wysokim wiązaniu znakowanej galaniny w tej strukturze wskazuje, że receptory te mogą być także transportowane z komórek neurosekrecyjnych do zakończeń nerwowych [59]. Eksperymentalne zastosowanie antagonisty(ów) receptora pozwala na identyfikację funkcji tego receptora w badanym procesie. Po dokomorowej infuzji antagonisty (*galantide*) receptora GAL-R1, jak i GAL-R2 [15] zaobserwowano zahamowanie zarówno podstawowego, jak i stymulowanego przez galaninę wzoru uwalniania GnRH i LH u samic szczura [70]. Na udział podwzgórzowych receptorów galaniny w pośredniczeniu jej oddziaływania na aktywność sekrecyjną neuronów GnRH, a w konsekwencji na profil uwalniania LH wskazuje też znaczące obniżenie ekspresji mRNA dla obu podjednostek LH obserwowane u owarietomizowanych i suplementowanych steroidami gonadowymi samic szczura, które otrzymywały jednoczesne infuzje antagonisty receptora GAL i galaniny [24]. Nie można jednak wykluczyć, iż stymulujące działanie galaniny na syntezę hormonu luteinizującego może także odbywać się poprzez aktywację receptorów galaniny bezpośrednio w przysadce. Wprawdzie nie jest jasne, czy i jakie podtypy receptora galaniny występują na komórkach gonadotropowych u samic, ponieważ GAL-R2 mRNA na tych komórkach zidentyfikowano dotychczas jedynie u samców [15]. Możliwość aktywacji takiego samego, zależnego od kinazy białkowej C szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej zarówno przez receptor GAL-R2 [91], jak i receptor GnRH stwarza dodatkową ścieżkę modulacyjną, poprzez którą galanina mogłaby wpływać na poziom ekspresji genów podjednostek LH w przysadce.

WAZOAKTYWNY PEPTYD JELITOWY A EKSPRESJA GENÓW α I LH β *IN VIVO*

Okazało się, że również wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) wyizolowany z komórek układu pokarmowego jest szeroko rozpowszechniony w obwodowym i centralnym układzie nerwowym [46]. Wpływ VIP na aktywność podwzgórza zależy od dwóch aferentnych szlaków VIP-ergicznym biegnących z ciała migdałowatego (*amygdala*) poprzez prążek końcowy (*stria terminalis*) [68] i ze śródmózgowia (*midbrain*) poprzez wiązkę przyśrodkową przodomózgowia (*medial forebrain bundle*) [53], jak też od syntezy tego peptydu w neuronach jądra nadskrzyżowaniowego (SCN) i okołokomorowego (PVN) [40]. W jądrze nadskrzyżowaniowym, położonym obustronnie u podstawy trzeciej komory mózgu w brzusznej części podwzgórza, jest zlokalizowany zegar biologiczny odpowiedzialny za regulację rytmów okołodobowych w organizmie ssaków. Jądro SCN aktywnie uczestniczy w regulacji okołowulacyjnego wyrzutu LH i prolaktyny, a leżące tego obszaru podwzgórza powodują stan ciągłego estrus u samic nieowarietomizowanych [8] oraz eliminują zależny od estradiolu wyrzut LH i prolaktyny u zwierząt owarietomizowanych. Spośród kilku neuropeptydów zidentyfikowanych

w SCN, głównie VIP syntetyzowany w jego brzuszno-bocznym (*ventrolateral*) regionie jest odpowiedzialny za uczestnictwo SCN w zależnej od pory dnia synchronizacji okołowulacyjnego wyrzutu LH z komórek przysadki. Umiejscowione w SCN neurony VIP wysyłają aksony m.in. do podwzgórza, w tym do obszaru przedwzrokowego, do przedniego i bocznego podwzgórza, do narządu naczyniowego blaszki końcowej (*organum vasculosum lamina terminalis*) i do pasma ukośnego Broca (*diagonal band of Broca*) [88]. Identyfikacja monosynaptycznego szlaku łączącego zlokalizowane w SCN neurony VIP z ok. 45% neuronów GnRH w podwzgórzu [89] stwarza neuroanatomiczne podstawy do bezpośredniej, zależnej od VIP modulacji aktywności neuronów GnRH. Jednakże neurony VIP, dochodząc z obszaru SCN do jądra okołokomorowego (PVN) i przykomorowego (Pe) [93], mogą również pośrednio wpływać na aktywność neuronów GnRH. Zablokowanie hamującego działania VIP na uwalnianie LH obserwowane po lezji jądra PVN dowodzi bezpośredniego działania VIP na neurony PVN i wskazuje na pośredniczącą rolę tego jądra w zależnej od VIP regulacji aktywności generatora pulsów GnRH [79]. VIP-ergiczna modulacja pulsacyjnego uwalniania GnRH może zachodzić także na poziomie wyniosłości pośrodkowej dokąd projektują neurony VIP i gdzie zidentyfikowano granule zawierające ten neuropeptyd [58]. Niewykluczone też, że VIP uwalniany z neuronów PVN do płynu mózgowego może być transportowany bezpośrednio do wyniosłości pośrodkowej przez wyspecjalizowane komórki (tanycyty) [3]. Także obserwowane po centralnych infuzjach VIP [96] zmniejszenie częstotliwości pulsów LH bez jednoczesnych zmian w ich amplitudzie wskazuje, że pierwotnym miejscem modulującego działania VIP na profil uwalnianego z przysadki LH jest podwzgórze. Choć dotychczas nie wyjaśniono, jakie substancje pośredniczą w hamującym oddziaływaniu VIP na aktywność neuronów GnRH i w konsekwencji na pulsacyjne uwalnianie LH, dotychczasowe dane wskazują, że w procesie tym nie jest zaangażowana dopamina [80] ani endogenne opioidy [97]. Fizjologiczne efekty VIP wywierane są przez dwa, o stosunkowo nieznacznej (47%) homologii ich pierwszorzędowej struktury, podtypy receptora: VPAC₁ i VPAC₂ [86], których pobudzenie wywołuje aktywację szlaku cyklicznej adenylanowej w komórce docelowej. Ostatnie badania wskazują, że fizjologiczny wpływ VIP na aktywność neuronów GnRH może odbywać się za pośrednictwem receptorów VPAC₂, które wykryto na ponad 40% neuronów GnRH u samic szczura [76]. Biorąc po uwagę, że VIP jest zaangażowany w modulację pulsacyjnego uwalniania GnRH z wyniosłości pośrodkowej, podjęto próbę wyjaśnienia (podobnie do β -endorfiny i galaniny) jego roli w biosyntezie LH w przysadce. W badaniach własnych wykazano, iż pulsacyjne (1 puls/godzinę przez 5 h) infuzje VIP do trzeciej komory mózgu samic owarietomizowanych i suplementowanych estradiolem spowodowały nie tylko zahamowanie uwalniania LH, lecz również znaczące zmniejszenie poziomu mRNA dla podjednostek α i LH β w przednim płacie przysadki [23]. Natomiast po zablokowaniu aktywności endogennego układu GnRH przez antagonistę (VIP-6-28) jego receptora [74] infundowane pulsacyjnie VIP nie powodował już dalszego obniżania zawartości mRNA dla obu podjednostek LH. Świadczy to o kluczowej roli funkcjonalnie aktywnego układu GnRH w odbiorze i przenoszeniu modulacyjnych oddziaływań VIP. Wykorzystując specyficznego antagonistę receptora w badaniach tych wykazano też, że modulujący wpływ VIP na ekspresję genów podjednostek

LH odbywa się poprzez receptory VIP, bowiem po jednoczesnych dokomorowych ko-infuzjach VIP 6-28 i VIP samicom szczura, peptyd ten nie zmniejszał poziomu mRNA dla obu podjednostek LH [23]. Nie można jednak wykluczyć, iż infundowany dokomorowo VIP może też częściowo działać bezpośrednio na poziomie przysadki, na przykład zmieniając przepływ krwi w układzie wrotnym i parametry uwalniania LH, tym samym wpływając hamująco na aktywność genów dla obu podjednostek LH.

AKTYWINA A EKSPRESJA GENU PODJEDNOSTKI FSH β W PRZYSADCE *IN VIVO*

O ile modulacyjny wpływ peptydów na poziom ekspresji genów α i LH β odbywa się pośrednio, poprzez ich wpływ na aktywność układu GnRH w podwzgórzu, to ekspresja genu FSH β w przysadce jest bezpośrednio regulowana przez aktywinę, inhibinę i folistatynę [56]. Peptydy te pierwotnie wyizolowano z płynu pęcherzykowego w jajniku [87], a następnie z komórek przysadki, gdzie syntetyzowane są zarówno w komórkach gonadotropowych, jak i komórkach pęcherzykowo-gwiaździstych (*folliculostellate cells*). Aktywina i inhibina należą do nadrodziny białek TGF β i są heterodimerami podjednostek $\alpha\beta_A$ i $\alpha\beta_B$ (inhibina A i B) lub $\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ i $\beta_A\beta_B$ (aktywina A, B i AB). Aktywina jest stymulatorem uwalniania FSH i ekspresji genu FSH β [47], wpływa bezpośrednio na transkrypcję tego genu [6], indukuje aktywność jego promotora w konstrukcjach z genem reporterowym [2], a także zwiększa stabilność FSH β mRNA w komórkach przysadki [9]. Zależne od aktywiny pobudzenie sygnalizacji wewnątrzkomórkowej poprzedzone jest serią zmian konformacyjnych w obrębie jej receptora na błonie komórkowej. Najpierw aktywina wiąże się do jednej z dwóch podjednostek typu II swego receptora (ActRII lub ActRIIB), co umożliwia uformowanie heteromerycznego kompleksu z podjednostką I receptora (ActRI lub ActRIB). Po utworzeniu takiego kompleksu aktywacji ulega kinaza serynowo/treoninowa podjednostki typu II, która fosforylując podjednostkę typu I zapoczątkowuje kaskadę fosforylacji na poziomie post-receptorowym. Choć aktywacja receptora aktywiny uruchamia kilka szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, najważniejszą jest kaskada białek Smad [11]. Spośród ośmiu poznanych białek Smad, aktywina pobudza białka Smad-2 i Smad-3, które są fosforylowane przez podjednostkę typu I receptora i następnie tworzą wiązający się z DNA kompleks z białkiem Smad-4 [72]. Ostatnio wykazano korelację pomiędzy indukowanym aktywiną wzrostem transkrypcji genu FSH β w komórkach przysadki a zwiększoną fosforylacją białek Smad-2 i Smad-3 [14]. Stymulujące oddziaływanie aktywiny na poziom ekspresji własnych receptorów w komórkach gonadotropowych [10] może znacząco wpłynąć na intensywność sygnału aktywującego transkrypcję genu FSH β . Odrębność szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej aktywowanych przez GnRH i aktywinę wskazuje na niezależne oddziaływanie obu peptydów na uwalnianie FSH i ekspresję genu FSH β . Istotnie, w badaniach własnych obserwowano odmienną dynamikę aktywacji uwalniania FSH z komórek gonadotropowych po dożylnych iniekcjach aktywiny i busereliny, gdyż po stymulacji busereliną (agonistą

receptora GnRH) znaczący wzrost uwalniania FSH następował szybciej i trwał dłużej niż po stymulacji aktywiną A [22]. O zaangażowaniu różnych ścieżek regulacyjnych w komórkach gonadotropowych po ich stymulacji aktywiną lub busereliną świadczy też obserwowana w tych badaniach odmienna czasowo dynamika zmian poziomu FSH β mRNA: już po 3 godzinach po iniekcji każdy peptyd znacząco stymulował ekspresję tego genu, jednak dalszy (po 5 godzinach) wzrost ekspresji obserwowano tylko po stymulacji busereliną. Również wyższa zawartość mRNA dla tego genu obserwowana po jednoczesnych iniekcjach tych peptydów [22] świadczy o synergistycznym oddziaływaniu aktywiny A i busereliny na ekspresję genu FSH β . Ostatnio, w badaniach na komórkach linii gonadotropowej L β T2 wykazano, że synergizm aktywiny i GnRH w regulacji aktywności transkrypcyjnej promotora genu FSH β wymaga ekspresji białka Smad3 i związany jest z palindromicznym, *cis*-działającym elementem regulatorowym zlokalizowanym w pozycji -266/-259 promotora tego genu [25]. Pobudzające działanie aktywiny na uwalnianie i biosyntezę FSH może także odbywać się poprzez jej stymulujący i niezależny od GnRH wpływ na syntezę receptorów GnRH zachodzący na poziomie transkrypcji genu receptora [16]. Możliwe jest także jej oddziaływanie na poziomie post-receptorowym, poprzez zaangażowanie w modulację zależnego od GnRH stężenia wapnia w komórce gonadotropowej.

PODSUMOWANIE

Zmienny wzorzec pulsacyjnie uwalnianego GnRH decyduje nie tylko o podstawowym i okołoolulacyjnym uwalnianiu gonadotropin, lecz pełni też krytyczną rolę w aktywacji transkrypcji genów α , LH β i FSH β , których promotory odznaczają się specyficzną wrażliwością na częstotliwość pulsów GnRH. W badaniach *in vivo* wykazano, że wyższa częstotliwość egzogennych pulsów efektywnie aktywuje ekspresję tylko genu α , zaś poziom mRNA dla podjednostek LH β i FSH β istotnie wzrasta dopiero po pulsach GnRH o niższej częstotliwości. Modulujący wpływ na ekspresję genów kodujących podjednostki gonadotropin wywierają syntetyzowane w podwzgórzcu peptydy, które uczestniczą w modulacji uwalniania GnRH. Po pulsacyjnych, dokomorowych infuzjach β -endorfiny obserwowano obniżenie poziomu mRNA dla podjednostek α i LH β w komórkach gonadotropowych i efekt ten mógł częściowo wynikać ze zmniejszonej stabilności mRNA obserwowanej po infuzjach tego peptydu. Również VIP działając poprzez swe specyficzne receptory obniża aktywność endogennego układu GnRH w podwzgórzcu i wpływa hamująco na poziom α i LH β mRNA w przysadce. Wzrost ekspresji genów α i LH β obserwowano natomiast po dokomorowych infuzjach galaniny, która podwyższając aktywność endogennego układu GnRH powoduje zwiększenie aktywności receptora GnRH. Stymulujące działanie galaniny na poziom α i LH β mRNA zależy od obecności sterydów gonadowych i wymaga aktywacji specyficznych receptorów dla galaniny. Poziom FSH β mRNA w przysadce podwyższany jest zarówno przez GnRH, jak i aktywinę. Peptydy te niezależnie i synergistycznie symulują ekspresję genu FSH β .

LITERATURA

- [1] ALARID ET, WINDLE JJ, WHYTE DB, MELLON PL. Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development* 1996; **122**: 3319–3329.
- [2] BAILEY JS, RAVE-HAREL N, MacGILIVRAY SM et al. Activin regulation of the follicle-stimulating hormone β -subunit gene involves Smad and TALE homeodomain proteins Pitx-1 and Prep1. *Mol Endocrinol* 2004; **18**: 1158–1170.
- [3] BARREA CM, KASTIN AJ, FASOLD MB, BANKS WA. Bidirectional saturable transport of LHRH across the blood-brain barrier. *Am J Physiol* 1991; **261**: E312–E318.
- [4] BEAUVILLAIN JC, MOYSE E, DUTRIEZ V et al. Localization of μ -opioid receptors on the membranes of nerve endings and tanycytes in the guinea-pig median eminence by electron microscopic radioautography. *Neuroendocrinology* 1992; **49**: 925–936.
- [5] BÉDÉCARRATS GY, KAISER UB. Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L β T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology* 2003; **144**: 1802–1811.
- [6] BERNARD DJ. Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone in mouse gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 2004; **18**: 606–623.
- [7] BOURET S, PREVOT V, CROIX D et al. Expression of GalR1 and GalR2 galanin receptor messenger ribonucleic acid in proopiomelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus: effect of testosterone. *Endocrinology* 2000; **141**: 1780–1794.
- [8] BROWN-GRANT K, RAISMANN G. Abnormalities in reproductive functions associated with the destruction of suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc R Soc Lond* 1997; **198**: 279–296.
- [9] CARROLL RS, CORRIGAN AZ, VALE W, CHIN W. Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1991; **129**: 1721–1725.
- [10] DALKIN AC, HAISENLEDER DJ, YASIN M et al. Pituitary activin receptor subtypes and follistatin gene expression in female rats: differential regulation by activin and follistatin. *Endocrinology* 1996; **137**: 548–554.
- [11] DERYNCK R, ZHANG YE. Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF β -family signaling. *Nature* 2003; **425**: 577–583.
- [12] DESJARDINS GC, BRAWER JR, BEAUDET A. Distribution of μ , δ and κ opioid receptors in the hypothalamus of the rat. *Brain Res* 1990; **536**: 114–123.
- [13] DRAGATSIS I, PAPAZAFIRI P, ZIOUDROU C, GEROZISSIS K. Opioids modify the release of LH at the pituitary level: *in vitro* studies with entire rat pituitaries. *J Endocrinol* 1995; **145**: 263–270.
- [14] DUPONT J, McNEILLY J, VAIMAN A et al. Activin signaling pathway in ovine pituitary and L β T2 cells. *Biol Reprod* 2003; **68**: 1377–1387.
- [15] FAHTI Z, CUNNINGHAM AM, IBEN LG et al. Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Mol Brain Res* 1997; **51**: 49–59.
- [16] FERNANDEZ-VASQUEZ G, KAISER UB, ALBARRACIN CT, CHIN WW. Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin-A. *Mol Endocrinol* 1996; **10**: 356–366.
- [17] FINLAY JCW, LINDSHON P, PETRUSZ P. Immunocytochemical localization of β -endorphin containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1981; **33**: 28–42.
- [18] FINN PD, STEINER RA, CLIFTON DK. Temporal patterns of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), *c-fos* and galanin gene expression in GnRH neurons relative to the luteinizing hormone surge in rat. *J Neurosci* 1998; **18**: 713–719.
- [19] GAGE PJ, SUH H, CAMPER SA. The *bicoid*-related Ptx gene family in development. *Mamm Genome* 1999; **10**: 197–200.
- [20] GAJEWSKA A, KOCHMAN K, LERRANT Y et al. Modulation of luteinizing hormone subunit gene expression by intracerebroventricular microinjection of gonadotropin-releasing hormone or β -endorphin in female rat. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1523**: 217–224.
- [21] GAJEWSKA A, LERRANT Y, COUNIS R, KOCHMAN K. FSH β subunit gene expression in long-term ovariectomized rat after pulsatile intracerebroventricular microinjections of GnRH. *Neuroendocrinol Lett* 2000; **21**: 277–281.
- [22] GAJEWSKA A, SIAWRYS G, BOGACKA I et al. *In vivo* modulation of follicle-stimulating hormone release and β subunit gene expression by activin A and the GnRH agonist buserelin in female rats. *Brain Res Bull* 2002; **58**: 475–480.

- [23] GAJEWSKA A, WOLIŃSKA-WITORT E, KOCHMAN K. Vasoactive intestinal peptide modulates luteinizing hormone subunit gene expression in the anterior pituitary in female rat. *Brain Res Bull* 2005; **67**: 319–326.
- [24] GAJEWSKA A, ZWIERZCHOWSKI L, KOCHMAN K. Stimulation of luteinizing hormone subunit gene expression by pulsatile intracerebroventricular microinjection of galanin in female rats. *J Neuroendocrinol* 2004; **16**:558–565.
- [25] GREGORY SJ, LACZA CHT, DETZ AA et al. Synergy between activin A and gonadotropin-releasing hormone in transcriptional activation of the rat FSH β -gene. *Mol Endocrinol* 2005; **19**: 237–254.
- [26] HAISENLEDER DJ, DALKIN AC, ORTOLANO GA et al. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency *in vivo*. *Endocrinology* 1991; **128**: 509–517.
- [27] HALVORSON LM, ITO M, JAMESON JL, CHIN WW. Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate luteinizing hormone β subunit gene expression. *J Biol Chem* 1998; **273**:14712–14720.
- [28] HARRIS D, BONFIL D, CHUDERLAND D et al. Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LH β -subunit promoter. *Endocrinology* 2002; **143**, 1018–1025.
- [29] HECKERT LL, SCHULTZ K, NILSON JH. The cAMP response elements of the α subunit gene bind similar proteins in trophoblasts and gonadotropes but have distinct functional sequence requirements. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31650–31656.
- [30] HECKERT LL, SCHULTZ K, NILSON JH. Different composite regulatory elements direct expression of the human α subunit gene to pituitary and placenta. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26497–26504.
- [31] HORVATH TL, KALRA SP, NAFTOLIN F, LERANTH C. Morphological evidence for a galanin-opiate interaction in the rat mediobasal hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 1995; **7**: 579–588.
- [32] HOWARD PW, MAURER RA. A point mutation in the LIM domain of Lhx3 reduces activation of the glycoprotein hormone α -subunit promoter. *J Biol Chem* 2001; **276**: 19020–19026.
- [33] HUANG H-J, SEBASTIAN J, STRAHL BD et al. Transcriptional regulation of the ovine follicle-stimulating hormone β gene by activin and gonadotropin-releasing hormone (GnRH): Involvement of two proximal activator protein sites for GnRH stimulation. *Endocrinology* 2001; **142**: 2267–2274.
- [34] HUANG H-J, WU JC, SU P, ZHIRNOV O, MILLER WL. A novel role for bne morphogenetic proteins in the synthesis of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 2001; **142**: 2275–2283.
- [35] INGRAHAM HA, LALA DS, IKEDA Y et al. The nuclear receptor steroidogenic factor acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 1994; **8**: 2302–2312.
- [36] JACKSON SM, GUTIERREZ-HARTMANN A, HOFFFLER JP. Upstream stimulatory factor, a basic-loop-helix-zipper protein, regulates the activity of the α -glycoprotein hormone subunit gene in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 278–291.
- [37] JIANG Q, JEONG K-H, HORTON ChD, HALVORSON LM. Pituitary homeobox (Pitx1) stimulates rat LH β gene expression via two functional DNA-regulatory elements. *J Mol Endocrinol* 2005; **35**: 145–158.
- [38] KAISER UB, HALVORSON LM, CHEN MT. Sp1, steroidogenic factor 1 (SF-1), and early growth response protein 1 (EGR-1) binding sites form a tripartite gonadotropin-releasing hormone response element in the rat luteinizing hormone β gene promoter: an integral role for SF-1. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 1235–1245.
- [39] KAISER UB, SABBAGH E, CHEN MT et al. Sp1 binds to the rat luteinizing hormone β gene promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone stimulated expression of the LH β subunit gene. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12943–12951.
- [40] KALSBECK A, BUIJS RM. Peptidergic transmitters of the suprachiasmatic nuclei and the control of circadian rhythmicity. In: *The Peptidergic Neuron*. (Joose J, Buijs RM, Tilders FJH eds) Prog Brain Res, vol. 92, Elsevier, Amsterdam, 1992: 321–333.
- [41] KELLY MJ, LOOSE MD, RONNEKLEIV OK. Opioids hyperpolarize β -endorphin neurons via μ -receptor activation of a potassium conductance. *Neuroendocrinology* 1990; **52**: 268–275.
- [42] KERI RA, NILSON JH. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone α subunit promoter in gonadotropes in transgenic rats. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10782–10785.
- [43] KINNEY GA, EMMERSON PJ, MILLER RJ. Galanin receptor-mediated inhibition of glutamate release in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 1998; **18**: 3489–3500.
- [44] KUPFERMANN I. Functional studies of cotransmission. *Physiol Rev* 1991; **71**: 683–694.

- [45] LAGNY-POURMIR I, EPELBAUM J. Regional stimulatory and inhibitory effects of guanidine nucleotides on ^{125}I galanin binding in the rat brain: relationships with the rate of occupancy of galanin receptors by endogenous galanin. *Neuroscience* 1992; **49**: 829–847.
- [46] LARSON L-I, FAHRENKRUG J, SCHAFFALITZKY De MUCKADELL O et al. Localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; **73**: 3197–3200.
- [47] LEE S, RIVIER C. Effect of repeated activin-A treatment on the activity of hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the adult male rat. *Biol Reprod* 1997; **56**: 969–975.
- [48] LERANTH C, Mac LUSKY NJ, SHANABROUGH M, NAFTOLIN F. Immunocytochemical evidence for synaptic connection between proopiomelanocortin-immunoreactive axons and LHRH neurons in the preoptic area of the rat brain. *Brain Res* 1988; **446**: 167–176.
- [49] LIPOSITS Z, REID J, NEGRO-VILAR A, MERCHENTHALER I. Sexual dimorphism in copackaging of luteinizing hormone-releasing hormone and galanin into neurosecretory vesicles of hypophysiotrophic neurons: estrogen dependency. *Endocrinology* 1995; **136**: 1987–1992.
- [50] LOPEZ FJ, MERCHENTHALER I, CHING M et al. Galanin: a hypothalamic-hypophysiotrophic hormone modulating reproductive functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4508–4512.
- [51] MAINS RE, EIPPER B, LING N. Common precursor to corticotropin and endorphins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 3014–3018.
- [52] MARKS DJ, SMITH MS, VRONTAKIS M et al. Regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1993; **132**: 1836–1844.
- [53] MARLEY PD, EMSON PC, HUNT SP. A long ascending projection in the rat brain containing vasoactive intestinal polypeptide. *Neurosci Lett* 1981; **27**: 261–266.
- [54] MARSHALL JC, DALKIN AC, HAISENLEDER D et al. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Rec Prog Horm Res* 1991; **47**: 155–187.
- [55] MARTINEZ de la ESCALERA G, CHOI ALH, WEINER RI. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses. Intrinsic properties of the GT-1 GnRH neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1852–1855.
- [56] MATHER JP, MOORE A, LI RH. Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; **245**: 200–202.
- [57] MERCHENTHALER I, LOPEZ FJ, NEGRO-VILAR A. Colocalization of galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in a subset of preoptic hypothalamic neurons: anatomical and functional correlates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6326–6333.
- [58] MIKKELSEN JD. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the circumventricular organs of the rat. *Cell Tissue Res* 1989; **255**: 307–313.
- [59] MITCHELL V, BOURET S, HOWARD AD, BEAUVILLAIN J-C. Expression of the galanin receptor subtype GALR2 in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 1999; **16**: 265–277.
- [60] MITCHELL V, HABERT-ORTOLI E, EPELBAUM J et al. Semiquantitative distribution of galanin-receptor (GAL-R1) mRNA-containing cells in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1997; **66**: 160–172.
- [61] MITCHELL V, PREVOT JC, BEAUVILLAIN JC. Distribution and diurnal variations of the μ -opioid receptor expression in the arcuate nucleus of the male rat. *Neuroendocrinology* 1998; **67**: 94–100.
- [62] NAOR Z, BENARD O, SEGER R. Activation of MAPK cascades by G-protein coupled receptor: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**: 91–99.
- [63] NISHIHARA M, HIRUMA H, KIMURA F. Interactions between the noradrenergic and opioid peptidergic system in controlling the electrical activity of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 1991; **54**: 321–326.
- [64] O'CONNOR JL, WADE MF, PRENDERGAST P et al. A 362 base pair region of the rat FSH β promoter contains multiple progesterone receptor binding sequences and confers progesterone responsiveness. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **136**: 67–78.
- [65] POULAIN P, DECROCQ N, MITCHELL V. Direct inhibitory action of galanin on hypothalamic arcuate nucleus neurons expressing galanin receptor Gal-R1 mRNA. *Neuroendocrinology* 2003; **78**: 105–117.
- [66] REYMOND MJ, KAUR C, PORTER JC. An inhibitory role for morphine on the release of dopamine into hypophysial portal blood and on the synthesis of dopamine in tuberoinfundibular neurons. *Brain Res* 1983; **262**: 253–258.
- [67] ROBERSON MS, SCHODERBEK WE, TREMML G, MAURER RA. Activation of glycoprotein hormone α -subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **142**: 141–152.

- [68] ROBERTS GW, WOODHAMS PL, BRYANT MG. VIP in the rat brain: evidence for a major pathway linking the amygdala and hypothalamus via the stria terminalis. *Histochemistry* 1980; **65**: 103–119.
- [69] ROSENBERG SB, COSS D, Mc GILLIVRAY BC, MELLON PL. Roles for SF-1 and NFY in the regulation of the mouse FSH β gene in L β T2 cells Program of the 84 th Meeting of The Endocrine Society. San Francisco, CA, 2002; p.187 (Abstract).
- [70] SAHU A, XU B, KALRA SP. Role of galanin stimulation of pituitary luteinizing hormone secretion as revealed by a specific receptor antagonist, galantide. *Endocrinology* 1994; **134**: 529–536.
- [71] SAUNDERS BD, SABBAGH E, CHIN WW, KAISER UB. Differential use of signal transduction pathways in the gonadotropin-releasing hormone-mediated regulation of gonadotropin subunit expression. *Endocrinology* 1998; **13**:1835–1843.
- [72] SHI Y, MASSAGUE J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685–700.
- [73] SHODEBERK WE, ROBERSON MS, MAURER MA. Two different DNA elements mediate gonadotropin releasing hormone effects on expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene. *J Biol Chem* 1993; **268**: 3903–3910.
- [74] SHOGE K, MISHIMA HK, SAITOH T et al. Protective effects of vasoactive intestinal peptide against delayed glutamate neurotoxicity in cultured retina. *Brain Res* 1998; **809**: 127–136.
- [75] SKOTFISH G, JACOBOWITZ DM. Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 1985; **6**: 509–546.
- [76] SMITH MJ, JENNES L, WISE PM. Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinology* 2000; **141**: 4317–4319.
- [77] STANISLAUS D, JANOVICK JA, BROTHERS S, CONN PM. Regulation of G_{q/11} α by the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 738–746.
- [78] STEGER DJ, HECHT JH, MELLON P. GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin α -subunit gene in the placenta and pituitary gland. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5592–5602.
- [79] STOBIE KM, WEICK RF. Effects of lesions of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei on the inhibition of pulsatile luteinizing hormone release by exogenous vasoactive intestinal peptide in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 1990; **51**: 649-657.
- [80] STOBIE KM, WEICK RF. Vasoactive intestinal peptide inhibits luteinizing hormone secretion: the inhibition is not mediated by dopamine. *Neuroendocrinology* 1989; **49**: 597–603.
- [81] STRAHL BD, HUANG H-J, SEBASTIAN J, MILLER WL. Transcriptional activation of the ovine follicle-stimulating hormone β -subunit gene by gonadotropin-releasing hormone involvement of two activating-protein binding sites and protein kinase C. *Endocrinology* 1998; **139**: 4455–4465.
- [82] SUSZKO MI, LO DJ, SUH H et al. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone β -subunit promoter by activin. *Mol Endocrinol* 2003; **17**: 318–332.
- [83] SWIRNOFF AH, APEL ED, SVAREN J et al. NAB-1, a corepressor of NGFI-A (EGR-1), contains an active transcriptional expression domain *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 512–524.
- [84] TREMBLAY JJ, DROUIN J. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Pitx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2567–2576.
- [85] TREMBLAY JJ, LANCTOT C, DROUIN J. The pan-pituitary activator of transcription, Pitx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pitx1 and is upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx 3. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 428–441.
- [86] USDIN T, BONNER M, MEZEY E. Two receptors for vasoactive intestinal peptide with similar specificity and complementary distribution. *Endocrinology* 1994; **135**: 2662–2680.
- [87] VALE W, RIVIER C, HSUEH A et al. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Rec Prog Horm Res* 1988; **44**: 1–34.
- [88] Van der BEEK EM, HORVATH TL, WIEGANT VM et al. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 1997; **384**: 569–579.
- [89] Van der BEEK EM, VIEGANT VM, van der DONK HA et al. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat. *J Neuroendocrinol* 1993; **5**: 137–144.
- [90] VASILJEV VV, PERNASETTI F, ROSENBERG SB et al. Transcriptional activation of the ovine follicle-stimulating beta gene by gonadotropin-releasing hormone involves multiple signal transduction pathways. *Endocrinology* 2002; **143**: 1651–1659.

- [91] WANG S, HASHEMI T, FRIED S et al. Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 receptor subtypes. *Biochemistry* 1998; **37**: 6711–6717.
- [92] WANG, JB, IMAI Y, EPPLER CM et al. μ -opiate receptors: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10230–10234.
- [93] WATTS AG, SWANSON LW. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol* 1987; **258**: 204–229.
- [94] WECK J, ANDERSON AC, JENKINS S et al. Divergent and composite gonadotropin-releasing hormone responsive elements in the rat luteinizing hormone subunit genes. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 472–485.
- [95] WECK J, FALLEST PC, PITT L, SHUPNIK MA. Differential gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 451–457.
- [96] WEICK RF, STOBIE KM, NOH KA. Effect of [4cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷]VIP on the inhibition of pulsatile LH release by VIP and related peptides in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 1992; **56**: 646–652.
- [97] WEICK RF, STOBIE KM. Role of VIP in the regulation of LH secretion in the female rat. *Neurosci Behav Rev* 1995; **19**: 251–259.
- [98] WOLFE MF, CALL GB. Early growth response protein binds to the luteinizing hormone β promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone-stimulated gene expression. *Mol Endocrinol* 1999; **13**: 752–763.
- [99] YOKOI T, OHMICHU M, TASAKA K et al. Activation of the luteinizing hormone β promoter by gonadotropin-releasing hormone requires *c-Jun* N-terminal protein kinase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21639–21647.
- [100] YOSHINO M., MIZUTANI T, YAMADA K et al. Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod* 2002; **66**: 1813–1819.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 18.11.2005 r.

Przyjęto: 20.01.2006 r.

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN,

05-110 Jabłonna k. Warszawy

e-mail: a.gajewska@ifzz.pan.pl